

癌細胞の分化誘導を標的とする新規化合物の開発に関する研究

高橋 典子

Induction of Cell Differentiation and Development of New Anticancer Drugs

Noriko TAKAHASHI

Department of Health Chemistry, Hoshi University, 2-4-41 Ebara,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received May 1, 2002)

Cell differentiation is essential for normal growth and homeostasis, and drug-induced differentiation of tumor cells into benign or normal cells is an important approach for anticancer chemotherapy. Studies of induction mechanisms for cell differentiation and discovery of differentiation-inducing factors are thus critical components of drug development. The Screening of differentiation-inducing factors, such as purified aldehyde reductase, a xenobiotic metabolite enzyme, that induces differentiation of human acute myeloid leukemia HL60 cells into monocyte/macrophage cells is described. Mechanisms of all-*trans*-retinoic acid (RA)-induced differentiation are also covered. RA is a potent inducer of HL60 cell differentiation and when used as a sole agent it can induce complete remission in patients with acute promyelocytic leukemia (APL). While one mechanism of the effect of RA involves RA nuclear receptors, retinoylation (a posttranslational modification of proteins by RA) may be a new nongenomic mechanism by which RA acts on cells. An early event in RA-induced differentiation may be retinoylation of RII α (regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase), in which RII α units are retinoylated and the retinoylated RII α is then translocated to the nucleus. Drugs can also be combined with RA in RA-differentiation therapy. Cytodifferentiation therapy by RA in APL patients exhibits limitations due to the resistance of relapsed patients to further RA treatment. This may occur through the induction of expression of various genes that reduce RA blood concentrations. Treatment with combinations of RA and other agents may be one way to reduce induction of those genes. Good candidates for such agents include cAMP-elevating agents, retinoids, steroids, and fatty acids that synergistically induce differentiation of HL60 cells. Two derivatives of falconensone A, falconensone A *p*-bromophenylhydrazone, which has a bromophenyl residue, and falconensone A dioxime, which possesses a hydroxy residue, were synthesized to incorporate features of RA and *N*-[4-hydroxyphenyl]retinamide. Both derivatives have exhibited more potent biological activity than the parent falconensone A *in vitro* and *in vivo*.

Key words—cell differentiation; retinoic acid; retinoylation; protein modification; anticancer drug; protein kinase A

1. はじめに

我々人間は、胚細胞の分化により種々の異なる機能を持った成熟細胞を形成し、一個体となる。また、一個体の人間は様々な化学物質、例えば環境因子、栄養因子、異物に暴露されて生活を営み、これらは生体の細胞に作用し生体内因子に影響を与えた結果、人間は変化（成熟、老化等）していく。これらの過程に細胞の分化は深く関わっている。人間にとって、正常な細胞分化を維持し続けることは必須であり、コントロールが崩れ未分化な細胞が生じた

場合、この異常細胞を正常な細胞に分化誘導することは非常に重要である。

癌（腫瘍）が分化誘導治療法で治癒するという概念はテラトカルシノーマ（奇形癌腫）の研究から見いだされた。¹⁾ この研究において、癌細胞から派生するいくつかの細胞は良性腫瘍細胞、あるいは正常様細胞に分化することが示された。すなわち、正常細胞と比較して恒常性を維持しにくい癌細胞（異常細胞）が周辺環境にตอบสนองして分化することが明らかにされた。

ヒト骨髄球性白血病細胞株（human myeloid leukemia cell line, HL60細胞）は造血系細胞の分化過程において、分化終末細胞（成熟血球）まで分化することのないまま増殖状態にある未分化な細胞であ

星薬科大学衛生化学教室（〒142-8501 品川区荏原 2-4-41）

*本総説は、平成14年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

る。種々の誘導剤は HL60 細胞を顆粒球様細胞、あるいは単球、マクロファージ様細胞に分化誘導する。これらの研究の中で、特に、レチノイン酸 (all-trans-retinoic acid, RA) による HL60 細胞の分化誘導に関する研究成果は、^{2,3)} 急性前骨髄性白血病患者 (APL) の白血病細胞が *in vitro* 及び *in vivo* で RA により終結分化するという発見に直接導き、RA は APL 患者の治療薬として用いられるようになった。^{2,4)}

2. 新規細胞分化誘導剤の探索

HL60 細胞が *in vitro* で刺激物質により分化誘導することを指標に分化誘導剤の探索を行ったところ、癌壊死因子 β (TNF β) として知られていたリンホトキシンやコロニー刺激因子 (GM-CSF) といった本来異なる機能を持つ蛋白質が分化も誘導した。^{5,6)} また、低分子アルデヒドフェノール化合物であるコレトクロリン B が分化誘導作用を示し、その極性基は作用に必須であった。⁷⁾ ついでこの研究が基点となり、長鎖脂肪酸アルデヒドを長鎖脂肪酸アルコールに還元する NADPH 依存性アルデヒド還元酵素に着目した。⁸⁻¹⁰⁾ ラット腎臓から精製した酵素蛋白質は HL60 細胞を単球・マクロファージ様細胞に分化誘導し、その ED₅₀ は 71 nM であった。¹¹⁾ この作用には酵素活性は必要ではなく、酵素蛋白質は細胞へ特異的に結合 (K_D=70 nM) した。以上、異物代謝酵素蛋白質が細胞の分化を誘導することが明らかとなった。

3. RA による細胞分化の新しい作用機構の解明

強力な細胞分化誘導剤である RA の作用機構は近年発見された RA 受容体 (RAR, retinoid X receptors) で説明される。¹²⁾ RAR はステロイド/甲状腺核受容体多遺伝子ファミリー (the steroid/thyroid nuclear receptor multigene family) の 1 つであり RA に高い親和性を持つ。これら核受容体は特別な DNA 配列を認識、結合してターゲット遺伝子の転写を開始させると一般的に受け入れられているが、RAR が分化に関与する直接の証拠は非常に限られている。HL60 細胞は RAR α と β を持ちその内 RAR α が HL60 細胞の RA による分化誘導作用に役割を果たすと考えられた。^{13,14)} また、P19 胚細胞の RA による分化に RAR β が間接的に関与する可能性が示された。¹⁵⁾ これに対して、RA 応答が非常に速いこと、RAR が RA により誘導された F9 胚

癌腫細胞の分化に関与しないこと、RAR が DNA と直接作用しない機構で機能しうること、^{16,17)} さらに、遺伝子を介さない RA の作用¹⁸⁻²²⁾ 等が報告された。これらの結果は RA により誘導される細胞分化過程に RAR に加えて別の作用機構が存在する可能性を示唆した。そこで、遺伝子を介さない (non-genomic) RA の作用機構として、蛋白質への RA のアシル化反応 (レチノイレーション) を提案した。²³⁻²⁷⁾

RAR とレチノイレーションの大きな違いは、RA が RAR に水素結合で結合するのに対して、レチノイレーションでは RA が蛋白質に共有結合する点である。レチノイレーションは蛋白質のリン酸化で代表されるように多くの蛋白質の性質、機能に影響を与える蛋白質修飾反応の 1 つとして捉えることができる。蛋白質修飾反応の例として、リン酸化、パルミトイル化、ミリストイル化、アセチル化、リポイル化、ADP-リボシル化、グリコシル化、イソプレニル化等が知られている。この内、蛋白質のパルミトイル化、ミリストイル化は CoA 中間体の形成を経る長鎖脂肪酸による蛋白質修飾反応であることはよく知られている。^{28,29)}

(1) レチノイレーション (RA による蛋白質のアシル化反応) レチノイレーションの代謝経路の 1 つはレチノイル CoA 中間体の形成とそれに伴って起こるレチノイル CoA の転移、そしてレチノイル部分の蛋白質中のアミノ酸への共有結合形成である (Fig. 1)。³⁰⁻³²⁾ 一方、レチノイル CoA が中間体でない場合は RA はチトクローム P-450 によって 4-ヒドロキシ RA に代謝され、蛋白質上のアミノ酸に O- エーテル、あるいは S- エーテルで結合している (Fig. 1)。³³⁾ また、RA 代謝物である 5,6-エポキシ-5,6-ジヒドロ RA (Fig. 1, 枠内) 等も蛋白質に共有結合を形成し得る。

レチノイレーションは HL60 細胞にとどまらず多くの細胞中で起こり、RA で修飾される蛋白質は細胞種によって異なっていた。^{23-26,34,35)} HL60 細胞においては S- エステル、O- エステル結合を加水分解する処理により約 90% の RA が蛋白質上のレチノイル化部位から遊離された。²⁴⁾ したがって、レチノイル CoA が中間体の場合 RA はパルミチン酸の結合のようにシステインに S- エステルで、また、チロシン、スレオニン、セリンに O- エステルで結

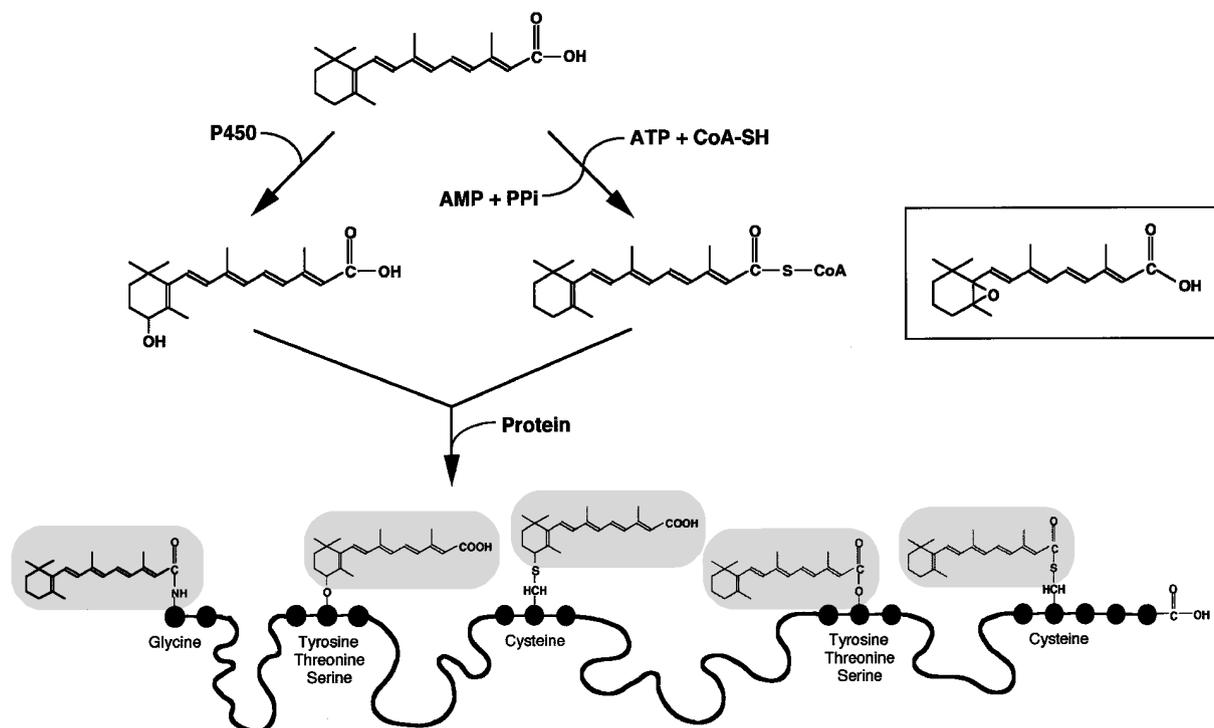


Fig. 1. Pathways for Protein Modification by RA

One metabolic pathway for retinoylation is the formation of a retinoyl-CoA intermediate and the subsequent attachment to a protein-cysteine *via* a thioester bond. If retinoyl-CoA is an intermediate then an O-ester or an amide linkage is formed. If retinoyl-CoA is not an intermediate then an O-ether or a thioether bond is formed.

合する。しかし、ヒトケラチン細胞においては共有結合した RA は上記と同じ処理をしてもほとんど遊離しなかった。²⁶⁾ これらの結果は、レチノイル CoA が中間体ではなく、4-ヒドロキシ RA の中間体形成を通して RA が蛋白質に O-エーテル、S-エーテルいずれかで結合していることを示す。一方、Schallreurer らは、チオレドキシ還元酵素蛋白質のシステイン残基に RA の C-13 又は C-14 いずれかの部位がチオエーテル結合することによって、13-シス RA による本酵素の構造特異的な阻害を説明している。³⁵⁾

レチノイル化はビタミン A 欠乏ラットの臓器中 (*in vivo*) でも起こり、腎臓、肝臓、肺の順にその量は多かった。また、RA と蛋白質はエステルで結合していた。³⁶⁾

レチノイル化は、レチノイル CoA 中間体の形成とレチノイル CoA の蛋白質中のアミノ酸への転移の二段階の反応から成る (Fig. 1)。最初のレチノイル CoA 生成反応を ³H-RA を用いて ³H-レチノイル CoA 量を測定することにより *in vitro* で検討したところ、肝臓の細胞画分の内ミクロソーム

画分で多く、ついで、膜・核画分でその比活性は高かった。各種臓器間のレチノイル CoA 生成量を比較すると、ミクロソーム画分では肝臓、精巣、腎臓の順に多く、粗抽出画分では腎臓、肝臓、精巣の順に多いことから、腎臓と肝臓・精巣ではレチノイル CoA の生成場所が異なっていた。次に、粗抽出画分を用いてレチノイル化を検討したところ、その量はレチノイル CoA 生成量と正の相関を示した。また、レチノイル CoA 生成量は時間、画分量、RA 濃度に依存して上昇、飽和し、RA に対する K_m は 2.4×10^{-8} M であり、 V_{max} は 1.0×10^{-4} $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein であった。さらに、レチノイル CoA 生成反応はパルミチン酸、ミリスチン酸、アラキドン酸、及びこれらの長鎖脂肪酸 CoAs により阻害された。以上の結果はレチノイル CoA は各臓器中で生成され、酵素により触媒されることを示した。

(2) レチノイル化の性質

1) レチノイル化蛋白質の核局在性と DNA への結合——HL60 細胞を用いてレチノイル化を調べたところ、レチノイル化は非常に速い

反応であり、その量は細胞外 RA 濃度に依存して飽和し、その ED₅₀ 値 (300 nM) は HL60 細胞の分化誘導作用の ED₅₀ 値 (100 nM) に近似していた。また、ほとんどのレチノイル化蛋白質は核に存在していた。²⁴⁾ レチノイル化蛋白質が DNA 結合蛋白質であるか否かを知るため、トリトン N101 (0.3%) によって核画分から抽出し、DEAE-カラムで部分精製したレチノイル化蛋白質を DNA-セルロースカラムで分析した。レチノイル化蛋白質は DNA-セルロースカラムに結合し 0.1 M NaCl で溶出されたことから、レチノイル化蛋白質は DNA 結合性を有していた。³⁴⁾

2) 細胞の RA に対する応答性とレチノイル化——レチノイル化の役割機能についてより一層の情報を得るため RA に対し応答性の異なる細胞を用いて検討を行った。²⁷⁾ HL60 細胞に比べ RA に対しより応答性の高い変異細胞株 (HL60/

MRI 細胞) のレチノイル化量 (モル結合/細胞) は HL60 細胞と比較して約 5 倍高い値を示した。HL60 細胞及び、HL60 細胞より RA に対し応答性の低い、すなわち、RA の分化誘導作用に耐性を示す変異細胞株 (HL60/RA-res 細胞) のレチノイル化量は同程度に同じ割合で生じた。これら三種類の細胞株のレチノイル化蛋白質の一次元電気泳動パターンは非常に類似していたが、二次元電気泳動パターンは異なっていた (Fig. 2)。すなわち、これらすべての細胞株に分子量 55,000, 等電点 4.9 の主レチノイル化蛋白質を認めたが、HL60/RA-res 細胞はこの蛋白質と同じ分子量で等電点がより酸性のレチノイル化蛋白質を高レベル含んでいた (Fig. 2)。

総レチノイル化量は RA 応答性胚癌腫細胞 (PCC4aza1R 細胞) の方が RA 耐性細胞 (PCC4 (RA)-2 細胞) より多かった。胚癌腫細胞のレチノ

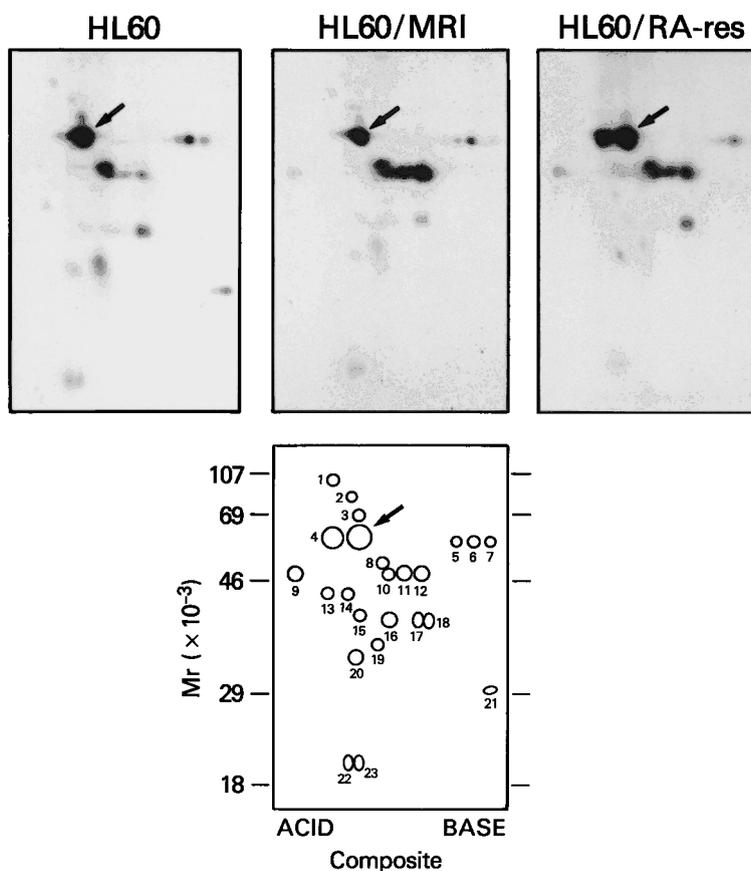


Fig. 2. Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Retinoylated Proteins in HL60, HL60/MRI, and HL60/RA-res Cells

Cells were grown in serum-free medium for 24 h in the presence of 100 nM [11,12-³H]-RA, 50—55 Ci/mmol. The protein residues were dissolved in isoelectric focusing buffer (pH 3.5—10) and analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and fluorography. Arrow shows the position of the major retinoylated protein.

イル化蛋白質の一次元電気泳動パターンは HL60 細胞のそれとは異なっていた。また、正常イヌ腎臓細胞 (MDCK 細胞) のレチノイル化蛋白質の一次元電気泳動パターンは HL60 細胞、胚癌腫細胞とは異なっていた。また、乳癌細胞 (MCF-7 細胞) のレチノイル化蛋白質の二次元電気泳動パターンは HL60 細胞とは異なっていた。²³⁾

これらの結果はレチノイレージョンが広範囲にわたって生じ、異なる細胞の RA に対する異なる応答が細胞中の異なる蛋白質のレチノイレージョンに起因することを示唆した。

3) 既存蛋白質のレチノイレージョン——HL60 細胞中に生じるレチノイレージョンが新しく合成された蛋白質上、あるいは既存の蛋白質上のいずれに起こるかを知るために、シクロヘキサミドの存在下でレチノイル化蛋白質の量を測定した。³⁴⁾ 全蛋白質合成の 86% を阻害することが知られている 3.6 μ M シクロヘキサミド存在下 RA と細胞を 48 時間インキュベーションしたところ、そのレチノイル化蛋白質量 (fmol/10⁶ 細胞) はシクロヘキサミド非存在下の細胞中のレチノイル化蛋白質量とほぼ同じレベルであった。この結果はレチノイレージョンが翻訳後 (既存) 蛋白質修飾であることを示した。

4) 長鎖脂肪酸による蛋白質のアシル化反応との相違——蛋白質のレチノイレージョンとパルミトイレージョンの間には類似性がある。すなわち、RA とパルミチン酸 (PA) の両者は既存蛋白質をアシル化しチオエステル結合で蛋白質に共有結合する。この類似性は同じ蛋白質が両脂肪酸の基質になりうるか否かという問題を提起する。HL60 細胞中約 120 の蛋白質が ³H-ミリスチン酸 (MA) で約 70 の蛋白質が ³H-PA で修飾されるが、これらと比較してわずか約 20 の蛋白質が ³H-RA で修飾されていた (Fig. 2)。したがって、より多くの HL60 細胞蛋白質が ³H-RA に比べて ³H-PA, ³H-MA により修飾されていた。³⁴⁾ ほとんどの蛋白質は一種類の脂肪酸で修飾されているが、主レチノイル化蛋白質は ³H-PA, ³H-MA の両方で修飾されていた。このように三種類の脂肪酸による蛋白質の修飾は、三種類の脂肪酸が同じアミノ酸上で競合する、あるいは共通の代謝経路を RA, PA, MA が共有するか否かという問題を提起する。しかし、³H-PA により修飾される主レチノイル化蛋白質の量は 1 μ M RA の添加で

減少しなかった。逆に、レチノイル化蛋白質の相対的な修飾は細胞外 PA 濃度依存的に減少しなかったが、500 μ M PA の添加でレチノイル化蛋白質量は増加した。また、主レチノイル化蛋白質の ³H-MA による修飾は 500 μ M PA の添加で減少しなかった。以上の結果は、RA, PA, MA は主レチノイル化蛋白質部位上で競合しないこと、また、いくつかの蛋白質はレチノイレージョン、パルミトイレージョン、ミリスチン酸の基質となりうることを示した。

5) 患者の白血病細胞の RA に対する応答性——急性骨髄性白血病細胞中の RA による蛋白質修飾反応を調べた。三人の患者から得られた白血病細胞蛋白質に認められたレチノイレージョンパターンは相互に類似し、これらは HL60 細胞のパターン (Fig. 2) に著しく類似していた。本実験条件下で細胞の増殖はなく細胞生存率は時間に依存して減少したことから、レチノイレージョンが細胞増殖に非依存的な翻訳後修飾であることを示唆した。また、レチノイレージョンのパターンを分析することにより患者の RA に対する応答感受性を推測することは可能である。

(3) レチノイル化蛋白質の同定

1) サイトケラチン——ヒト表皮ケラチン細胞中の主レチノイル化蛋白質はその二次元電気泳動上の移動位置と抗ケラチンモノクローナル抗体による免疫染色の結果に基づいてサイトケラチン (cytokeratin) と同定した。²⁶⁾ サイトケラチンに共有結合する ³H-RA はメタノール-水酸化カリウムを使用する緩和な加水分解処理によって除かれないことから、RA とサイトケラチンはチオエステルで共有結合していなかった。

2) ビメンチン——HL60 細胞中の分子量 55,000, 等電点 4.9 の主レチノイル化蛋白質 (p55^{RA}) は、MonoQ アニオン交換クロマトグラフィから溶出した p55^{RA} の二次元電気泳動上の移動位置と抗ビメンチンモノクローナル抗体による免疫染色の結果に基づいて中間フィラメント蛋白質であるビメンチン (vimentin) と同定した。³⁷⁾ ビメンチンに結合する ³H-RA はメタノール-水酸化カリウム、あるいはヒドロキシルアミンを使用する緩和な加水分解処理により約 50% 遊離した。したがって、ビメンチンと RA の結合はサイトケラチンの場

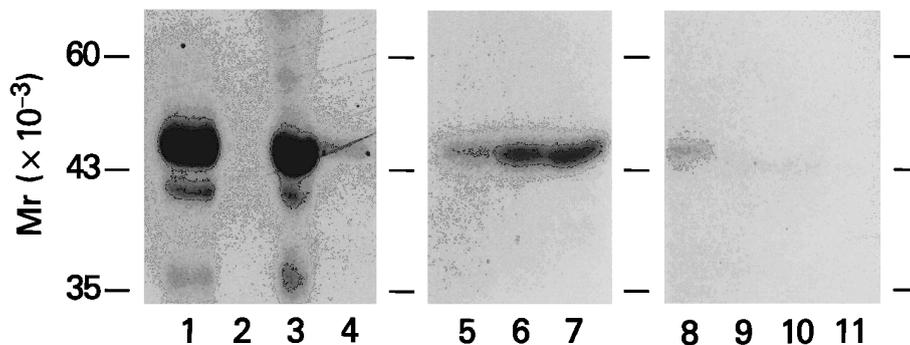


Fig. 3. Immunoprecipitation of RII

HL60 cells were grown in serum-free medium with and without 100 nM [^3H]RA. Cell extracts were labeled by 8-azido- ^{32}P cAMP and immunoprecipitated with anti-RII antiserum. Lane 1 is a portion from the solubilized fraction, untreated with antiserum and protein A-Sepharose. Lane 2 shows the immunoprecipitate from the initial solubilized fraction carried out with protein A but without antiserum. Lanes 3 and 4 show the immunoprecipitated 8-azido- ^{32}P cAMP labeled protein (lane 4) and the nonimmunoprecipitated proteins remaining in the soluble fraction (lane 3) after treatment of the solubilized fraction with 8 μl of anti-RII antiserum and protein A-Sepharose. The gel (lanes 1–4) was exposed to the film for 3 days. Lanes 5–7 show the levels of protein specifically immunoprecipitated as a function of increasing concentrations of anti-RII antiserum (lane 5, 4 μl ; lane 6, 8 μl ; and lane 7, 16 μl). The gel (lanes 5–7) was exposed to the film for 13 days. Lanes 8–11 show the specificity of this immunoprecipitation with the anti-RII antiserum. Lane 8, 4 μl of anti-RII antiserum; lanes 9–11, 4, 8, and 16 μl of normal rabbit serum, respectively. The gel (lanes 8–11) was exposed to the film for 13 days. The cells used for lanes 1–4 were grown with 100 nM [^3H]RA. The cells used for lanes 5–11 were grown without RA. The band containing the radioactivity shown in lane 4 was cut from the gel and the ^{32}P and ^3H determined in a liquid scintillation counter. We found 1.2 fmol of RA and 0.4 fmol of 8-azido-cAMP present in this band.

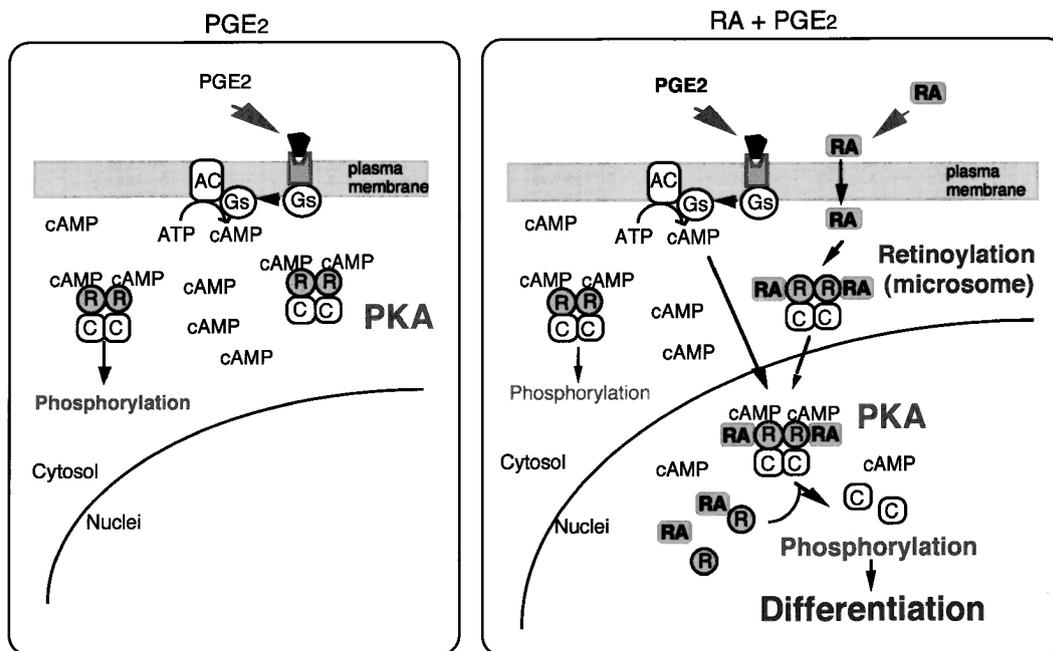
合とは異なりエステル結合であった。またレチノイル化ビメンチンは核、特に核膜に存在していた。

3) プロテインキナーゼ A の調節サブユニット (cAMP 結合蛋白質) ——いくつかのレチノイル化蛋白質は cAMP 結合蛋白質 (cAMP-binding protein) であるプロテインキナーゼ A (cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素: PKA) の調節サブユニットであった。²⁵⁾ 8-アジド- ^{32}P -cAMP で共有結合標識した五種の PKA の調節サブユニット (the regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase) は ^3H -RA の HL60 細胞への処理により修飾された分子量 37,000 (p37^{RA}), 47,000 (p47^{RA}), 51,000 (p51^{RA}) のレチノイル化蛋白質と二次元電気泳動上で同じ位置に移動した。さらに、p47^{RA} は I 型 PKA (PKA I) と MonoQ アニオン交換クロマトグラフィ上で共溶出し、p51^{RA} は II 型 PKA (PKA II) と同クロマトグラフィ上で共溶出した。PKA I の cAMP 結合調節サブユニット (RI α) に対する特異抗体は p47^{RA} を免疫沈降し、また、PKA II の cAMP 結合調節サブユニット (RII α) に対する特異抗体は p51^{RA} を免疫沈降した (Fig. 3)。³⁸⁾ これらの結果は PKA の RI α と RII α の両調節サブユニットがレチノイル化されていることを示した。また RI α , RII α は RA とエステルで結合していた。

(4) RA による分化誘導作用とレチノイル化

1) PKA の調節サブユニット (RII α , RI α) のレチノイル化——蛋白質を修飾する時間、及びその量は蛋白質修飾反応が機能的に重要であるかどうかの判定基準となる。HL60 細胞を 100 nM ^3H -RA 存在下 24 時間インキュベーションした後のレチノイル化蛋白質の約 80% はビメンチンであり、約 10% は PKA の RII α であった。しかし、5 分間インキュベーションした後では RII α のみが修飾されていた。³⁹⁾ また、HL60 細胞中、ビメンチンの一部がレチノイル化されているのに対して、RII α の 1 mol に 1.4 mol の RA、RI α の 1 mol に 6 mol の RA が結合していた。³⁹⁾ さらに、レチノイル化された PKA の RII α は核内に存在していた。したがって、RA で誘導される HL60 細胞の分化の初期の反応に RII α のレチノイル化が深く関与していることが示唆された。

2) cAMP 生成誘導薬と RA による分化誘導作用 (プライミング効果)——多くの細胞種 (myeloid leukemia,^{40–48)} teratocarcinoma,^{47,49–54)} melanoma,⁵⁵⁾ kidney⁴⁷⁾ の細胞を含む) における生物学的な反応 (細胞の増殖、分化等) は RA と cAMP の密接な相互作用により生じることが報告されている。cAMP 生成誘導薬 (cAMP-inducing agents) の細胞への処理は RA で誘導された F9 胚癌腫細胞 (F9 embryonal carcinoma 細胞)^{51–53)} と HL60 細胞⁴³⁾ の分化を増大させた。そして、逐次処理 (プライミン

Fig. 4. PGE₂ Combined with RA

グ), すなわち, まず RA, 次に cAMP 生成誘導薬の順に細胞を処理すると分化を相乗的に誘導するが, その順序を逆にするとその効果がなかった.^{43,51,52} したがって, RA 処理は cAMP の応答を変える変化を誘導している可能性が示唆された. 種々の蛋白質リン酸化酵素による特異的な蛋白質のリン酸化は細胞調節において主要な役割を演じるが, その中で PKA は cAMP の調節サブユニット (R) への結合が引き金となり蛋白質をリン酸化する.⁵⁶ この PKA 活性は細胞に RA を処理した後に増加する.^{40,44-46,49,55,57} 逆に, RA 処理は細胞内 cAMP レベルを変化させない.^{46,55,58,59} したがって, cAMP の量ではなく, PKA 活性の変化が RA と cAMP 生成誘導薬の併用で認められた相乗効果を現す起因である可能性が示唆された.

3) レチノイル化 PKA と cAMP 生成誘導薬——一般的に, PKA 活性の増加は PKA 蛋白質の増加によってもたらされる. しかし, HL60 細胞において, シクロヘキサミドによる蛋白質合成の阻害は RA によるプライミング,⁴³ 及び蛋白質のレチノイル化³⁴ を阻止しない. したがって, RA によるこのプライミング効果は PKA 蛋白質の合成を増加させる必要がないので, ここに示した RI α , RII α のレチノイル化が細胞内 PKA 活性の変

化に関与している可能性が示唆された.

cAMP 生成誘導薬として, プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は良く知られており, RA による HL60 細胞の分化を増強させた.⁶⁰ HL60 細胞膜には PGE₂ レセプターサブタイプのうち EP2, EP3, EP4 が発現しており, EP2 サブタイプのアゴニストと RA が HL60 細胞の分化を相乗的に誘導させることから, EP2 が細胞分化に関与していた.⁶¹ 以上の結果を統合すると, HL60 細胞に PGE₂ を単独処理した場合, cAMP 生成を促し細胞質内の PKA が細胞質内の蛋白質をリン酸化する (Fig. 4). 一方, RA を処理した場合, RA は細胞質内の PKA の調節サブユニット R をレチノイル化することにより PKA を核内に移行させ, 核内蛋白質のリン酸化を促進して分化を誘導する. その際, PGE₂ を併用すると cAMP 生成を促し核内の PKA による核内の蛋白質のリン酸化を増大させ分化を促進することが示唆された (Fig. 4).

(5) リガンドと蛋白質の共有結合形成によるシグナル伝達 本研究においてはレチノイル化が広範囲に及び, RA は多くの既存蛋白質に共有結合していることを示した. レチノイル化蛋白質の性質と未同定のレチノイル化蛋白質の解明はレチノイル化の役割・機能に限らず, 異なる細胞に

種々の相反する作用を示すミラクルな RA 作用を理解する鍵と考えられる。

RA 受容体は RA の作用に必要と考えられているが RA による細胞分化における RA 受容体の直接の役割は明らかではない。急性非リンパ系白血病患者の細胞と白血病細胞株 (HL60 細胞, HL60/RA-res 細胞) の研究において RA により分化が誘導されている細胞内の RAR レベルは少し増加するが RA の作用と RAR α との相関は見られないと報告されている。^{62,63} また, RA により分化している細胞中で RA と RAR との複合体が DNA に結合して細胞内蛋白質の発現を調節しているという報告は全くない。これに対して, レチノイレーションは分化誘導中の細胞内の最終反応を測定している。RA による分化誘導過程において, レチノイレーションと RAR 両者がいかに協力して RA の作用を発現するかは非常に興味深いところである。

現在, RA にとどまらずステロイド/甲状腺ホルモンが蛋白質と共有結合していることを見出し,^{64,65} 酵素有機化学反応 (共有結合形成) と生物作用発現との相関を解析し, リガンドの蛋白質への共有結合形成によりシグナル伝達がなされ生理作用が発現されるという新しいシグナル伝達機構の普遍性を検討している。

4. 分化誘導促進剤を用いた分化誘導療法

RA を初めとするレチノイドは, 自然界に存在し, また微量栄養素であるビタミン A (レチノール) の合成類縁体として知られているが, 多くの癌モデルにおいて癌細胞の増殖を抑制して, 癌細胞の分化を誘導する。また, RA は経口投与で摂取され APL 患者の約 95% を完全寛解させる。⁴ このように分化誘導療法は化学療法とは異なり癌細胞にのみ作用し, 正常細胞に大きな影響を与えないので副作用が少なく, 治癒率が非常に高いという利点を持つ。

RA は APL 患者に有効な細胞分化誘導治療薬ではあるが, RA 単独投与で完全寛解した患者は 2—3 カ月後に高い割合で白血病を再発する。そして, 再発した患者の白血病細胞が *in vitro* で RA に対し応答しても, ほとんどの患者は見かけ上 RA に対して耐性となる。そこで, RA を投与した再発患者の変化について調べたところ, 患者の血中の RA 濃度は非常に低く, 白血病細胞中の RA 結合蛋白質量は著しく増加していた。⁶⁰ これらのことから, (a) RA の

代謝酵素であるチトクローム P-450 が誘導され RA の代謝が亢進し RA 濃度が減少した, (b) 細胞内の RA 結合蛋白質量が増加し RA は結合蛋白質に結合しているため (不活性型, 貯蔵型), 生理作用を発揮できる遊離 RA の濃度が減少した, (c) 多剤耐性遺伝子 (multidrug resistant 1 mRNA, MDR1 mRNA) 及び *p*-glycoprotein が発現し細胞内 RA を細胞外に放出したため, 細胞内 RA 濃度が低下した可能性等が指摘された。⁶⁶ すなわち, いずれも RA の大量投与により種々の遺伝子が誘導され, 細胞内の RA の濃度が激減したことを表している。

一般的に, 薬剤の併用投与は種々の微生物感染治療, 癌化学療法, 発癌予防法等において, 単独投与よりもより効果的である。そこで, 治療に使う RA 濃度を減少させることにより, 上記の蛋白質の誘導を抑え, 細胞内の RA 濃度を高く維持することができると考えた。すなわち, 低濃度の RA と他の薬剤を併用することによって, RA 単独で用いる場合と同等の効果を得ることを試みた。分化治療法において RA と併用する薬剤について下記する。

(1) レチノイド

1) Am80, Ch55—Am80 はテレフタル酸アニリド誘導體, Ch55 はチャルコンカルボン酸誘導體である。これらの化合物の末端のカルボキシル基と脂溶性基の間隔は一定であり, RA のその間隔とほぼ等しい (Fig. 5A)。放射標識された RA, Am80, Ch55 を使用して, RA, Am80, Ch55 による細胞分化誘導活性と蛋白質の共有結合修飾との間に正の相関があるかを検討した。⁶⁷ 無血清培養条件下では, RA, Ch55 は用量依存的に HL60 細胞の分化を誘導したのに対し, Am80 は誘導しなかった。Am80 は血清含有培養条件下では分化を誘導する。一方, 無血清培養条件下, RA, Ch55 は HL60 細胞蛋白質と共有結合したが, Am80 はほとんど結合しなかった。二次元電気泳動で放射標識蛋白質を分離, 解析したところ, そのパターンは RA と Ch55 では異なっていた。しかし, PKA II の RII サブユニット (蛋白質 11), PKA I の RI サブユニット (蛋白質 14) を含む数種の蛋白質は両レチノイドで共標識された。一方, 無血清培養条件下, レチノイレーション量は Am80 添加によって増加し, RA と Am80 あるいは Ch55 の併用で HL60 細胞の分化を相乗的に誘導した。以上の結果から, レチノイレーションと

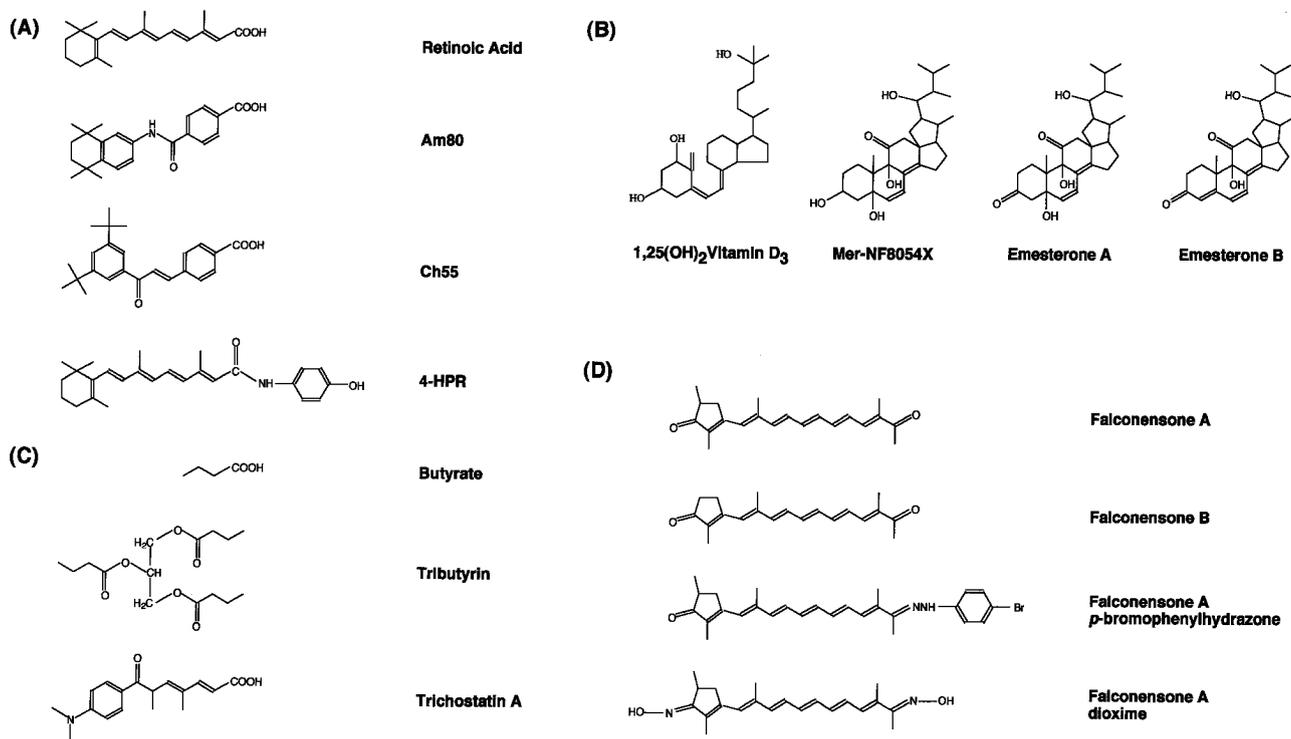


Fig. 5. Structures of Retinoids, Steroids, Fatty Acids and Falconenones

分化誘導作用には正の相関関係があり、レチノイドによる蛋白質修飾反応が HL60 細胞の分化誘導において重要な働きをしている可能性が示唆された。また、Am80 と Ch55 は核内レセプターに結合するが、無血清培養条件下では核内レセプターへの結合能と HL60 細胞の分化誘導作用は相関しなかった。

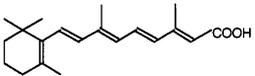
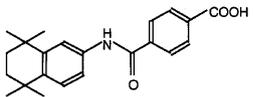
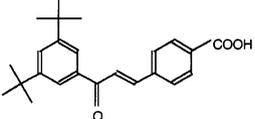
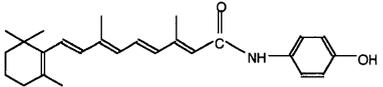
2) 4-HPR——4-HPR は RA の末端のカルボキシル基にヒドロキシルフェニルアミン基が結合した化合物である (Fig. 5A)。4-HPR は有効な癌化学予防剤、癌細胞増殖抑制剤であるが、核内レセプターと結合しないのでその作用機構はよく分かっていない。無血清培養条件下では、4-HPR は用量依存的に HL60 細胞の分化を誘導するが、RA と比較すると非常に弱い分化誘導作用しか示さなかった。⁶⁸⁾ しかし、4-HPR と RA の併用で相乗的に HL60 細胞の分化を誘導し、その際、4-HPR は細胞内レチノイレーション量を増加させた。一方、4-HPR は細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが知られている。以上の結果から、レチノイレーションと分化誘導作用に相関関係が認められ、単独で細胞分化誘導能が弱い薬剤でも RA と併用することにより臨床的に使用できる可能性を示唆

した。

3) まとめ——RA, Am80, Ch55 は核内レセプターに結合するが、4-HPR は結合しない (Table 1)。無血清培養条件下、RA, Ch55, 4-HPR 単独で HL60 細胞の分化を誘導するのに対して、Am80 は誘導しなかった。これらすべてのレチノイドは低濃度の RA と併用すると RA による分化誘導作用を増強し、レチノイレーション量も増加させた。各リガンドの蛋白質への共有結合形成を検討したところ、RA と Ch55 は共有結合形成を示すのに対して、Am80 は示さなかった。以上の結果から、レチノイド単独の分化誘導作用は核内レセプターへの結合性の有無よりも、レチノイドと蛋白質との共有形成に相関していた。また、これらすべてのレチノイドは RA による分化誘導作用を増強させ、かつレチノイレーション量を増加させることから、細胞内 RA 濃度を高めている可能性が示唆された。

(2) ステロイド：Mer-NF8054X 砂漠に生息する耐熱性の子囊菌である *Emericella heterothallica* は無機培地中で容易に増殖するため培養が安価で行えること、また菌体内で合成された化合物は菌体外 (培養液中) に分泌されるので化合物の単離、

Table 1. Comparison of RA, Am80, Ch55, and 4-HPR

		Binding to RAR	Serum free			
			Differentiation	Synergistic effects in the combination with RA	Increasing retinoylation	Covalent binding
	Retinoic acid	+	+	ND	+	+
	Am80	+	-	+	+	-
	Ch55	+	+	+	+	+
	4-HPR	-	+	+	+	ND

精製が比較的容易であるという利点をもつ。本菌から、cycloergostan 骨格を持つ新規エルゴステロイド三種が単離され構造が決定された (Fig. 5B)。Mer-NF8054X, Emesterone A, Emesterone B は水酸基を順に 4, 3, 2 個有する (Fig. 5B)。Mer-NF8054X 単独で濃度、時間依存的に HL60 細胞を単球・マクロファージ様細胞に分化誘導した。⁶⁹⁾ また、Mer-NF8054X は強い細胞増殖抑制作用を現し、RA との併用で相乗的に細胞の分化を誘導した。Mer-NF8054X の 3 位の水酸基がカルボニル基になった Emesterone A は Mer-NF8054X に比べて弱い増殖抑制作用、分化誘導作用を示した。Emesterone A の 5 位の水酸基の欠失した Emesterone B は Emesterone A より強く Mer-NF8054X より弱い作用を示した。これらの結果は、Mer-NF8054 とその類縁体は新しいタイプの分化誘導剤であり、3 位、5 位の水酸基は作用発現に必要なが必須ではないこと、Mer-NF8054X は RA による分化誘導作用を増強させることを明らかにした。したがって、Mer-NF8054X は RA との併用で白血病患者の治療に利用できる可能性が見いだされた。

1,25(OH)₂ ビタミン D₃ (1,25(OH)₂D₃) (Fig. 5B) は HL60 細胞の分化誘導剤として非常に優れているが、細胞内カルシウム濃度に大きな影響を与えるので臨床的に副作用が強く使用できない。1,25

(OH)₂D₃ に似た構造を持つ Mer-NF8054X の細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響を検討することは大変興味深い。

(3) 脂肪酸 酪酸 (butyric acid, BA) は HL60 細胞分化誘導剤であり、クロマチンに存在するヒストンの脱アセチル化を阻害することが知られている (Fig. 5C)。トリブチリン (BA のプロドラッグ) (tributylin, TB) は 3 個の BA を持ち、TB 1 mol が 3 mol の BA に相当する (Fig. 5C)。単独処理の場合、HL60 細胞の分化能に対する ED₅₀ 値は RA で 0.11 μM, BA で 480 μM, TB で 130 μM であった。^{60,70)} モル比を 1000 : 1 (BA or TB : RA) として併用した場合、その ED₅₀ 値は BA が 38 μM, RA が 38 nM, TB が 13 μM, RA が 13 nM となった。特に、TB を RA と併用することにより、50% 分化誘導活性を得るために必要とされる化合物の RA 濃度は、単独の場合と比較して 8—10 分の 1 に減少した。

最近、この RA と BA の併用による相乗効果が核内レセプターで説明されつつある。一般的にヒストンのアセチル化はクロマチンの活性遺伝子のところで活発である。RXR, RAR の共役抑制因子である SMRT, mSin3A が脱アセチル化酵素 (HDAC1, mRPD3) と複合体を形成しており、脱アセチル化酵素阻害剤によって RA による転写活性は亢進する。^{71,72)} また、共役活性因子である CBP/p300,

SRC-1 にアセチル化酵素活性が認められた。^{73,74)} 一方、トリコスタチン A (Fig. 5C) は BA と同様にヒストンの脱アセチル化を阻害することが知られているが、構造上 BA よりも RA によく類似している。現在、BA とレチノイレーションの関係を検討している。

(4) 細胞分化誘導療法 細胞分化誘導療法は癌細胞にのみ作用して癌細胞を正常様細胞に分化誘導するため、癌細胞ターゲティング療法の1つと考えられる。したがって、正常細胞に影響を与えず、化学療法に見られるような副作用が非常に少ない。このような理由からか、白血病の患者はカプセルに封入された RA を毎日経口的に摂取している。現在、RA の多量投与による RA 耐性が問題となっている最中、RA はよく効く薬であることは間違いないのであるから、RA の投与方法、剤形を考え直す時期がまさにきている。これと同時に、細胞分化誘導療法において、分化誘導作用を増強する薬物(細胞分化誘導剤、アポトーシス誘導剤、cAMP 生成誘導薬、cAMP 様作用薬等)の探索、及びそれらの *in vivo* での検討を行うことは重要である。また、細胞分化誘導療法の他の癌に対する応用も期待される。

5. 抗癌剤の設計とその効果

Falconensone A と B は、南米ベネズエラの土壌より分離された新種の子囊菌である *Emericella falconensis* NHL2999 株の菌体の塩化メチレン抽出エキス中より単離されその構造が決定された新しいタイプの黄色化合物である。Falconensone A と B の違いは cyclopentenone 環の 4' 位にメチル基を有するか否かである。これらの化合物は芳香環に共役二重結合が連なるポリエンであり、RA と構造上類似している (Fig. 5D)。そこで、falconensone A をシード化合物とし、RA 及び、抗癌剤として臨床試験が行われている 4-HPR をモデル化合物として抗癌剤の創製を試みた。これら 3 種類の化合物の構造を比較すると、RA はカルボキシル基 (-COOH) を持つのに対して、falconensone A と B は極性基(活性基)を持たない。リガンドと蛋白質の共有結合修飾が細胞内シグナル伝達に重要であるならばリガンドの極性基は必須である。そこで、falconensone A の 2 位のカルボニル基を *p*-bromophenylhydrazine により置換した falconensone A *p*-

bromophenylhydrazone (Br 誘導体)、及び falconensone A の 2 位、及び 3' 位のカルボニル基にヒドロキシルアミンを用いてオキシム置換した falconensone A dioxime (Ox 誘導体) を合成し、各種生物学的作用を検討した (Fig. 5D)。⁷⁵⁻⁷⁸⁾

(1) 抗癌作用 HL60 細胞の増殖抑制作用を検討したところ、血清含有培養条件下で、10 μ M falconensone A は HL60 細胞の増殖を約 25% 抑制するのに対し、falconensone A の合成誘導体である Br 誘導体及び Ox 誘導体は、約 55%、約 60% と falconensone A に比べてより強い作用を示した。次に、分化誘導作用を検討したところ、無血清培養条件下において falconensone A 単独は HL60 細胞の分化を誘導するが、血清含有培養条件下では分化をほとんど誘導しなかった。⁷⁸⁾ しかし、両合成誘導体は血清の有無に関わらず細胞の分化を誘導し、誘導された細胞は RA の場合とは異なり単球・マクロファージ様細胞であった。また、10 nM RA と falconensone A を併用することによって HL60 細胞の分化は相乗的に誘導された。さらにアポトーシス誘導作用を DNA のフラグメンテーション及び TUNEL 法を用いて調べたところ、falconensone A、Br 誘導体、Ox 誘導体は HL60 細胞のアポトーシスを誘導した。その強さは Ox 誘導体、Br 誘導体、falconensone A の順に強力であり、細胞増殖抑制作用と正の相関を示したが、活性酸素種の生成量とは相関しなかった。⁷⁷⁾ 一方、芳香環の 4' 位にメチル基を持たない falconensone B はいずれの作用においても影響を与えなかった。

(2) 抗酸化作用 抗酸化作用を α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能を指標に検討した。ビタミン E の 1 モルが 2 モルの DPPH ラジカルを消去するのに対し、Br 誘導体、Ox 誘導体は cysteine と同様に、1 モルの Br 誘導体及び Ox 誘導体は 1 モルの DPPH ラジカルを消去した。⁷⁶⁾ しかし、falconensone A と falconensone B は効果を示さなかった。次に、リノール酸の過酸化抑制能を調べたところ、ビタミン E の過酸化抑制作用を 100% とすると、Br 誘導体は 175%、falconensone A は 115% となり、また濃度依存的に抗酸化作用を示した。そして falconensone B 及び Ox 誘導体にも約 60-70% の抗酸化作用が認められた。さらに、ラット肝臓のミクロソーム膜の脂質過酸化抑制

能を測定したところ、ビタミン E, falconensone A, falconensone B はほとんど影響を与えなかったが、Br 誘導体, Ox 誘導体は濃度依存的に過酸化脂質の生成を抑制し強い抗酸化作用を示した。

(3) 各種ヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制作用

1) ヒト急性前骨髄球性白血病細胞——HL60R 細胞は細胞形態においては HL60 細胞と類似しているが RA に対して耐性を示す。^{13,14} HL60 細胞及び HL60R 細胞 (2×10^5 cells/ml) に、各化合物 ($1 \mu\text{M}$ RA, $10 \mu\text{M}$ falconensone A, $10 \mu\text{M}$ falconensone B, $10 \mu\text{M}$ Br 誘導体, $10 \mu\text{M}$ Ox 誘導体) を添加し、時間経過における細胞数の変化を調べた。HL60 細胞においては、コントロールの細胞数を 100% とした時、Br 誘導体, Ox 誘導体は RA よりも初期の段階で強い細胞増殖抑制作用を示した (Fig. 6A).⁷⁵

また、115 時間後、Ox 誘導体, Br 誘導体, RA, falconensone A は順に約 60%, 50%, 50%, 40% の細胞増殖を抑制した (Fig. 6A)。次に、RA 耐性株である HL60R 細胞においては、 $1 \mu\text{M}$ RA は全く作用を示さなかったが、falconensone A, Br 誘導体及び Ox 誘導体は時間依存的に増殖を抑制し、119 時間後に約 65% の細胞増殖抑制作用を示した (Fig. 6B)。また、両細胞において falconensone B は作用を示さなかった。以上の結果から、falconensone B 以外の falconensones は RA 耐性に関わらず白血病細胞の増殖を抑制することを確認した。

2) ヒト乳癌細胞——現在精力的に研究がなされているヒト乳癌細胞について、生細胞染色法である 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法を用いて生細胞を定量すること

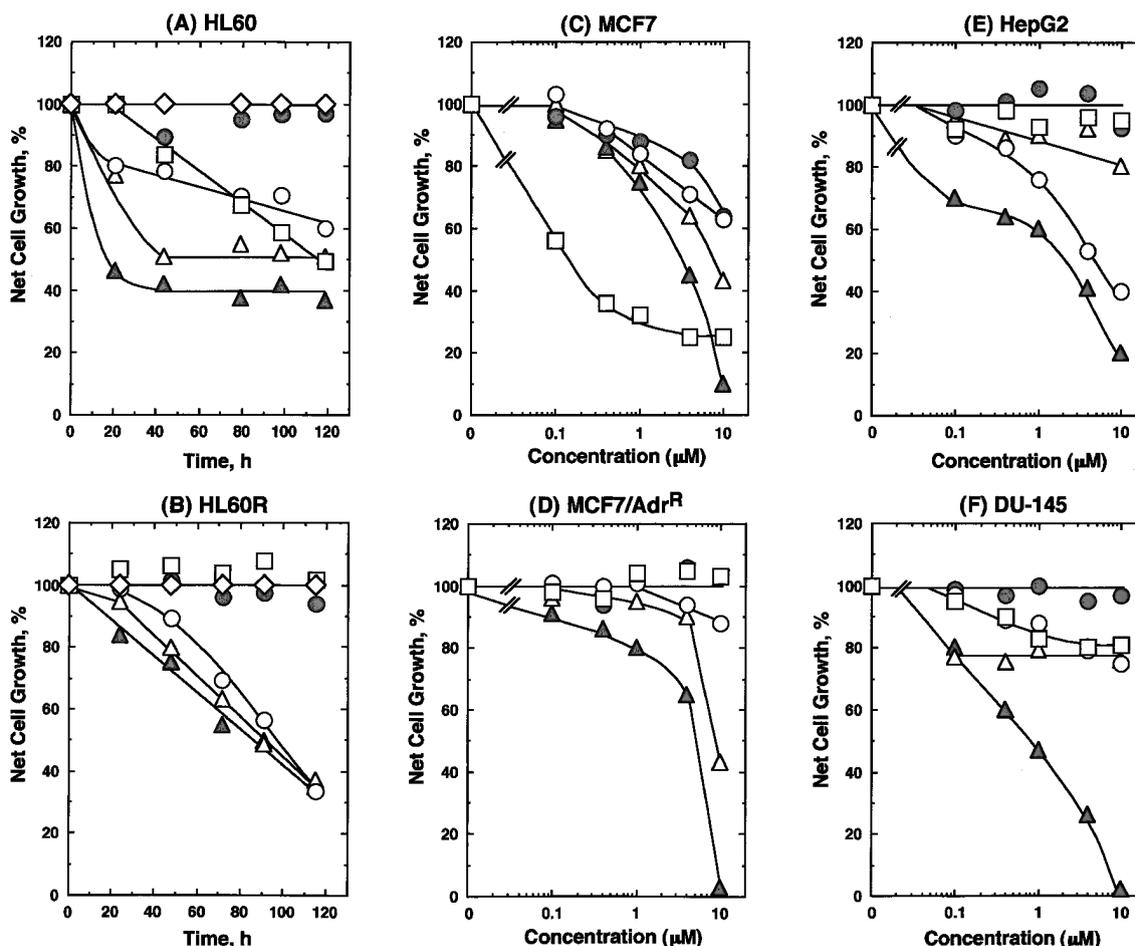


Fig. 6. Growth of Various Human Cancer Cells in the Presence of Falconensones

A, B: HL60 or HL60R cells was grown without (◇) or with $1 \mu\text{M}$ RA (□) and falconensones (falconensone A (○), falconensone B (●), falconensone A p-bromophenylhydrazone (△) and falconensone A dioxime (▲) at a concentration of $10 \mu\text{M}$ in medium containing 10% FBS. C, D, E, F: MCF-7, MCF-7/Adr^R, HepG2, or DU-145 cells was grown without or with various concentration of RA (□) and falconensones (falconensone A (○), falconensone B (●), falconensone A p-bromophenylhydrazone (△) and falconensone A dioxime (▲) in medium containing 10% FBS. Growth was measured at 72 h. Each point is the mean of at least four measurements. The SE of each point was $\leq 8\%$ of the mean.

により細胞増殖抑制作用を検討した。MTT法は細胞数や細胞核数を実測するのではなく、MTTで生細胞を染色し相対的な細胞量を測定する方法である。ヒト乳癌細胞として、MCF-7細胞とエストロゲンレセプターを有せずRAに対して耐性を示すMCF-7/Adr^R細胞（adriamycin耐性ヒト乳癌細胞）を用いた。コントロールの細胞数を100%として化合物の各濃度添加における細胞数を%で示した。MCF-7細胞においては、RAは低濃度でも細胞増殖抑制作用を示すのに対し、falconensonesは1—10 μ Mで濃度依存的に細胞増殖を抑制した（Fig. 6C）。各化合物10 μ Mの細胞増殖抑制作用を比較すると、falconensone A、及びfalconensone Bは約37%、Br誘導体は約60%、Ox誘導体は約90%の細胞増殖を抑制していた（Fig. 6C）。RA耐性細胞株であるMCF-7/Adr^R細胞においては、RAはほとんど影響を与えず、10 μ M falconensone Aは約11%とMCF-7細胞の場合よりも弱い抑制作用を示した（Fig. 6C, 6D）。これに対し、Br誘導体、及びOx誘導体はMCF-7細胞の場合と同程度の抑制作用を示し、10 μ Mでは順に約58%、約98%の細胞増殖を抑制した（Fig. 6D）。以上の結果から、Br誘導体及びOx誘導体はRA耐性に関わらず乳癌細胞の増殖を抑制した。

3) ヒト肝癌細胞及びヒト前立腺癌細胞——我が国の肝癌による死亡率は欧米と比較して高く、肝癌は他の臓器の癌細胞が転移してなる場合も多い。また前立腺癌は近年劇的に増加しており、欧米では活発に研究がなされている。そこでヒト肝癌細胞であるHepG2細胞、及びヒト前立腺癌細胞であるDU-145細胞におけるfalconensonesの影響について検討した。HepG2細胞においては、RAはほとんど作用を示さず、10 μ Mでもわずか約6%しか細胞増殖を抑制しなかった（Fig. 6E）。またBr誘導体は濃度依存的に作用を増強したが、10 μ Mで約20%の細胞抑制作用しか示さなかった。これに対しfalconensone A及びOx誘導体は強い細胞増殖抑制作用を示し、10 μ Mで順に約60%、約80%を示した（Fig. 6E）。DU-145細胞においては、RAとfalconensone Aは濃度依存的に細胞増殖抑制作用を示すが、10 μ Mで約20%しか抑制しなかった（Fig. 6F）。またBr誘導体は0.1—10 μ Mの濃度範囲で約20%の抑制作用を示した。これに対し、Ox

誘導体は0.1 μ Mから強い細胞増殖抑制作用を示し、10 μ Mでは細胞増殖をほぼ100%抑制していた（Fig. 6F）。一方、falconensone Bはいずれの細胞株においても全く効果を示さなかった。以上の結果から、Ox誘導体は肝癌細胞及び前立腺癌細胞の増殖を著しく減少させた。

4) まとめ——RAはHL60細胞及びMCF-7細胞に顕著な作用を示したが、他の細胞株に対してはほとんど影響を与えなかった。一方、天然物質であるfalconensone Aの作用は弱いものの、すべての癌細胞株の増殖を抑制した。これに対し、cyclopentenone環の4'位にメチル基を持たないfalconensone Bは、ほとんどの細胞株に対して細胞増殖抑制作用を示さなかった。したがって、falconensoneの抗癌活性に4'位のメチル基は必須であることが明らかとなった。また、falconensone Aの合成誘導体であるBr誘導体及びOx誘導体は、falconensone Aよりも強い効果をすべての癌細胞株に対して示した。特に、Ox誘導体は多種の癌細胞に対して有効であり、前立腺癌細胞に顕著な作用を示した。Br誘導体及びOx誘導体の作用はHL60細胞及びMCF-7細胞においてRA作用と同程度に強く、RAが効果を示さないRA耐性細胞株（HL60R, MCF-7/Adr^R）、HepG2細胞及びDU-145細胞に対しても強力であった。以上、RA耐性癌細胞を含む種々のヒト癌細胞に対して、Br誘導体及びOx誘導体は親化合物のfalconensone Aよりも強力な抗癌作用を有していた。

(3) 転移性肝癌マウスへの延命効果 HepG2を用いた*in vitro*実験においてfalconensonesに抗癌効果のあることが明らかとなった。そこで、falconensonesの*in vivo*評価を行うために、転移性肝癌マウスを用いて延命効果を検討した。⁷⁵⁾肝癌を作製するために使用したM5076細胞は卵巣由来細胞腫瘍で、これをマウスに尾静脈投与すると肝臓や脾臓、まれに肺に転移し、最終的には肝癌で死亡することが知られている。したがってM5076細胞を用いた抗癌作用の検討は、falconensonesの種々の腫瘍に対する作用と、転移性腫瘍に対する作用を理解する上で有効であると考えた。Falconensoneは肝臓に特異的に薬物を運搬するリポソームである大豆由来ステロールグルコシド混合物含有リポソーム(SG-Liposome)に封入した。既に、SG-Liposome

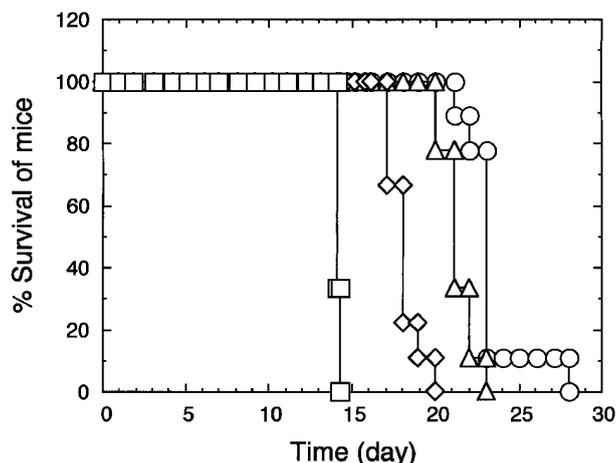


Fig. 7. Effects of Liposomal Falconensones on Survival of M5076-Implanted Mice

Mice were weighed daily. Survival times were recorded in days after M5076 implanting ($n=9$). Liposomal falconensone A (◇), falconensone A *p*-bromophenylhydrazone (△), falconensone A dioxime (○) and sterile saline (□).

で封入した抗癌剤の高い治療効果が報告されている。⁷⁹⁾ 転移性肝癌マウスへ0日目にSG-Liposomeに封入したfalconensones(最終血中濃度が $50\mu\text{M}$)とM5076細胞を尾静脈投与し、8日目に化合物を再投与した。M5076細胞を移植した転移性肝癌マウスの肝臓は正常マウスの臓器と比較して、肥大し、白っぽく、表面に斑点が見られた。⁷⁵⁾

Falconensonesを投与したときのマウスの生存曲線をFig. 7に示した。コントロール群と比較してfalconensone A群、Br誘導体群、Ox誘導体群いずれの化合物も生存日数を延長させた。これらfalconensonesの治療効果を判定するために、各群の平均生存日数(mean survival time)、生存日数中央値(median survival time)、及び延命率(increase in life span: %ILS)を算出し、生存日数をクラスカル・ワーリス検定法(Kruskal-Wallis test)で判定した結果、4群間いずれにも0.1%以下の危険率で有意差が見られた。またコントロール群と各falconensone群間の生存日数をスチューデントの*t*検定法(Student's *t*-test)で判定したところ、コントロール群に対しfalconensone A、Br誘導体、Ox誘導体すべてのfalconensone群に0.1%以下の危険率で有意差が認められた。さらに、各延命率はfalconensone Aで28.2%、Br誘導体で50.0%、Ox誘導体で64.1%と求められた。以上、falconensone A、Br誘導体、Ox誘導体は、転移性肝癌マウスに

対して有意な延命効果を示した(Fig. 7)。

(4) 癌転移・転移性肝癌への効果 これら化合物がどの段階に作用し延命効果を与えるかを知るために、*in vitro*でM5076細胞の増殖抑制作用を調べた。その結果、falconensone AはM5076細胞の増殖を約98%と著しく抑えるが、Br誘導体では弱くOx誘導体では全く影響を与えなかったことから、Fig. 7で示した延命効果はM5076細胞の増殖抑制作用と相関しなかった。したがって、falconensonesは移植した癌細胞の増殖に直接作用したのではなく、癌細胞の転移過程、あるいは転移癌細胞の増殖に変化をもたらした結果、延命効果を現した可能性が示唆された。

以上、falconensone Aに極性基の導入したBr誘導体及びOx誘導体は*in vitro*及び*in vivo*において強力な抗癌作用を有していた。また、falconensone Aのcyclopentenone環の4'位にメチル基は作用発現に必須であった。以上の結果は、リガンド(化合物)と蛋白質の共有結合形成が作用発現に重要である可能性を示唆し、これらの標識化合物を作製できれば修飾されている蛋白質が明らかとなる。

6. おわりに

細胞分化に関する研究は永遠の課題であり、正常な分化を理解するために非常に大切である。細胞分化が損なわれた時疾病が現れ、正常な分化に戻す分化誘導剤は疾病治療薬となる。細胞分化誘導療法は細胞自身が持つ分化能を引きだすため副作用が少なく、上記したような薬剤併用分化誘導療法(combination therapy)は最高の治療法となりうると確信している。

本研究において、新しい概念であるリガンドと蛋白質との共有結合形成によるシグナル伝達機構を分化誘導剤であるRAを用いて解明し提唱した。この基礎的知見を基盤にして、作用の弱い化合物から強力な生理活性物質を創製することができた。本研究はかなり独創的な新規性を有し、遂行するにあたり非常に孤独で弛まない努力と忍耐の継続が必要であったが、驚くべき発見が多くあり非常に楽しく行うことができた。今後さらに研究を進め、癌にとどまらず老化・痴呆予防薬、成人病の研究に発展させていきたい。

謝辞 本研究に際し、御懇篤なる御指導、御鞭

捷, 御助言を賜りました京都大学薬学部の市川厚先生, 米国国立衛生研究所癌研究所の T. R. Breitman 博士に謹んで深くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり, 御指導, 御協力, 御支援をいただきました星薬科大学の永井恒司先生, 福井哲也先生, 河合賢一先生, 米谷芳枝先生, 岩堀明代博士, 清水一征博士, 渡辺聡博士, 山崎正博博士, 久保義典修士, 玉川佳世子修士, 和田将志修士, 京都大学薬学部の根岸学先生, 富田謙吉先生, 斉藤光実先生, 石黒須美恵修士, 根本憲一修士, 相模中央化学研究所の沼尾長徳先生, 加藤誠志先生, 米国国立衛生研究所の Terrence Burke, Jr. 博士, Wayne B. Anderson 博士, Janet M. Hauser 修士, オスロ大学医学部の Karry R. Norum 先生, Anne M. Myhre 先生に深く感謝申し上げます。

化合物を御提供いただきました東京大学薬学部之首藤紘一先生, 橋本祐一先生, 影近弘之先生, 及びシカゴ大学の Richard C. Moon 博士に謹んでお礼申し上げます。

本研究は文部省科学研究費, 公益信託林女性自然科学者研究助成基金, 星薬科大学大谷記念研究助成金のほかに, 持田記念医学薬学振興財団, 内藤記念科学振興財団, 三共生命科学振興財団から奨励金をいただき行うことができたものであり, 深く感謝申し上げます。

REFERENCES

- Pierce G. B., Speers W. C., *Cancer Res.*, **48**, 1996-2004 (1988).
- Breitman T. R., Collins S. J., Keene B. R., *Blood*, **57**, 1000-1004 (1981).
- Breitman T. R., Selonick S. E., Collins S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2936-2940 (1980).
- Huang M. E., Ye Y. C., Chen S. R., Chai J. R., Lu J. X., Zhou L., Gu L. J., Wang Z. Y., *Blood*, **72**, 567-572 (1988).
- Hemmi H., Nakamura T., Tamura K., Shimizu Y., Kato S., Miki T., Takahashi N., Muramatsu M., Numao N., Sugamura K., *J. Immunol.*, **138**, 664-666 (1987).
- Kato S., Miki T., Takahashi N., Ohmori M., Hemmi H., Numao N., Kondo K., *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, **5**, 663-670 (1989).
- Takahashi N., Osada H., Numao N., Saimoto H., Kawabata T., Hiyama T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 452-455 (1988).
- Takahashi N., Saito T., Tomita K., *Biochim. Biophys. Acta.*, **748**, 444-452 (1983).
- Takahashi N., Saito T., Goda Y., Tomita K., *J. Biochem.*, **99**, 513-519 (1986).
- Takahashi N., Saito T., Goda Y., Tomita K., *Biochim. Biophys. Acta*, **963**, 243-247 (1988).
- Takahashi N., Breitman T.R., Saito T., Ichikawa A., *J. Biol. Chem.*, **264**, 15624-15627 (1989).
- Kastner P., Mark M., Chambon P., *Cell*, **83**, 859-869 (1995).
- Robertson K. A., Emami B., Mueller L., Collins S. J., *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3743-3749 (1992).
- Robertson K. A., Emami B., Collins S. J., *Blood*, **80**, 1885-1889 (1992).
- de Groot R. P., Pals C., Kruijer W., *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1585-1591 (1991).
- Kitabayashi I., Kawakami Z., Chiu R., Ozawa K., Matsuoka T., Toyoshima S., Umesono K., Evans R. M., Gachelin G., Yokoyama K., *EMBO. J.*, **11**, 167-175 (1992).
- Kitabayashi I., Chiu R., Umesono K., Evans R. M., Gachelin G., Yokoyama K., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **11**, 761-768 (1994).
- Bolmer S. D., Wolf G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6541-6545 (1982).
- Smith T. J., Davis F. B., Davis P. J., *Biochem. J.*, **284**, 583-587 (1992).
- Smith T. J., Davis F. B., Deziel M. R., Davis P. J., Ramsden D. B., Schoenl M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1199**, 76-80 (1994).
- Varani J., Burmeister B., Perone P., Bleavins M., Johnson K. J., *Am. J. Pathol.*, **147**, 718-727 (1995).
- Crowe D. L., *J. Cell. Sci.*, **106**, 183-188 (1993).
- Takahashi N., Breitman T. R., *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **25**, 1199-1200 (1989).
- Takahashi N., Breitman T. R., *J. Biol. Chem.*, **264**, 5159-5163 (1989).
- Takahashi N., Liapi C., Anderson W. B., Breitman T. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 293-302 (1991).
- Takahashi N., Jetten A. M., Breitman T. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 393-400 (1991).

- 27) Takahashi N., Breitman T. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 105–110 (1991).
- 28) Towler D. A., Gordon J. I., Adams S. P., Glaser L., *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 69–99 (1988).
- 29) Schultz A. M., Henderson L. E., Oroszlan S., *Annu. Rev. Cell Biol.*, **4**, 611–647 (1988).
- 30) Wada M., Fukui T., Kubo Y., Takahashi N., *J. Biochem.*, **130**, 457–463 (2001).
- 31) Renstrom B., DeLuca H. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **998**, 69–74 (1989).
- 32) Genchi G., Olson J.A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1530**, 146–154 (2001).
- 33) Williams J. B., Napoli J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4658–4662 (1985).
- 34) Takahashi N., Breitman T. R., *J. Biol. Chem.*, **265**, 19158–19162 (1990).
- 35) Schallreuter K. U., Grebe T., Pittelkow M. R., Wood J. M., *Skin Pharmacol.*, **4**, 14–20 (1991).
- 36) Myhre A. M., Takahashi N., Blomhoff R., Breitman T. R., Norum K. R., *J. Lipid Res.*, **37**, 1971–1977 (1996).
- 37) Takahashi N., Breitman T. R., *J. Biol. Chem.*, **269**, 5913–5917 (1994).
- 38) Ekanger R., Sand T. E., OGREID D., Christoffersen T., Doskeland S. O., *J. Biol. Chem.*, **260**, 3393–3401 (1985).
- 39) Breitman T. R., Takahashi N., *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 723–727 (1996).
- 40) Fontana J. A., Reppucci A., Durham J. P., Miranda D., *Cancer Res.*, **46**, 2468–2473 (1986).
- 41) Hemmi H., Breitman T. R., *Jpn. J. Cancer Res.*, **76**, 345–351 (1985).
- 42) Olsson I. L., Breitman T. R., *Cancer Res.*, **42**, 3924–3927 (1982).
- 43) Olsson I. L., Breitman T. R., Gallo R. C., *Cancer Res.*, **42**, 3928–3933 (1982).
- 44) Fontana J. A., Emler C., Ku K., McClung J. K., Butcher F. R., Durham J. P., *J. Cell. Physiol.*, **120**, 49–60 (1984).
- 45) Elias L., Stewart T., *Cancer Res.*, **44**, 3075–3080 (1984).
- 46) Plet A., Evain D., Anderson W. B., *J. Biol. Chem.*, **257**, 889–893 (1982).
- 47) Taub M., *J. Cell. Physiol.*, **141**, 24–32 (1989).
- 48) Davies P. J., Murtaugh M. P., Moore W. T. Jr., Johnson G. S., Lucas D., *J. Biol. Chem.*, **260**, 5166–5174 (1985).
- 49) Plet A., Evain-Brion D., Gerbaud P., Anderson W. B., *Cancer Res.*, **47**, 5831–5834 (1987).
- 50) Plet A., Gerbaud P., Anderson W. B., Evain-Brion D., *Cancer Res.*, **48**, 3993–3997 (1988).
- 51) Strickland S., Smith K. K., Marotti K. R., *Cell*, **21**, 347–355 (1980).
- 52) Kuff E. L., Fewell J. W., *Dev. Biol.*, **77**, 103–115 (1980).
- 53) Rizzino A., Crowley C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 457–461 (1980).
- 54) Martin C. A., Ziegler L. M., Napoli J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4804–4808 (1990).
- 55) Ludwig K. W., Lowey B., Niles R. M., *J. Biol. Chem.*, **255**, 5999–6002 (1980).
- 56) Greengard P., *Science*, **199**, 146–152 (1978).
- 57) Reynaud F., Leduc C., Anderson W. B., Evain-Brion D., *J. Invest. Dermatol.*, **89**, 105–110 (1987).
- 58) Breitman T.R., Keene B. R., *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation*, **9**, 691–702 (1982).
- 59) Lotan R., Giotta G., Nork E., Nicolson G. L., *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**, 1035–1041 (1978).
- 60) Breitman T. R., Chen Z. X., Takahashi N., *Semin. Hematol.*, **31**, 18–25 (1994).
- 61) Ishiguro S., Takahashi N., Nemoto K., Negishi M., Ichikawa A., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **56**, 145–153 (1998).
- 62) Largman C., Detmer K., Corral J. C., Hack F. M., Lawrence H. J., *Blood*, **74**, 99–102 (1989).
- 63) de The H., Marchio A., Tiollais P., Dejean A., *EMBO J.*, **8**, 429–433 (1989).
- 64) Takahashi N., Breitman T. R., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 489–497 (1992).
- 65) Takahashi N., Breitman T. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 10807–10811 (1992).
- 66) Kizaki M., Ueno H., Yamazoe Y., Shimada M., Takayama N., Muto A., Matsushita H., Nakajima H., Morikawa M., Koeffler H. P., Ikeda Y., *Blood*, **87**, 725–733 (1996).
- 67) Takahashi N., Breitman T. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 82–89 (1994).
- 68) Takahashi N., Sausville E. A., Breitman T. R., *Clin. Cancer Res.*, **1**, 637–642 (1995).
- 69) Takahashi N., Fukui T., Iwahori A., Kubo Y.,

- Hosoe T., Kawai K., *Exp. Cell. Res.*, **245**, 313–320 (1998).
- 70) Breitman T. R., He R. Y., *Cancer Res.*, **50**, 6268–6273 (1990).
- 71) Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J. G., Chen H., Evans R. M., *Cell*, **93**, 229–240 (1998).
- 72) Heinzl T., Lavinsky R. M., Mullen T. M., Soderstrom M., Laherty C. D., Torchia J., Yang W. M., Brard G., Ngo S. D., Davie J. R., Seto E., Eisenman R. N., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G., *Nature*, **387**, 43–48 (1997).
- 73) Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H., Nakatani Y., *Cell*, **87**, 953–959 (1996).
- 74) Spencer T. E., Jenster G., Burcin M. M., Allis C. D., Zhou J., Mizzen C. A., McKenna N. J., Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J., O'Malley B. W., *Nature*, **389**, 194–198 (1997).
- 75) Tamagawa K., Shimizu K., Ebine T., Maitani Y., Fukui T., Kawai K. I., Takahashi N., *Clin. Cancer. Res.*, **7**, 3551–3558 (2001).
- 76) Takahashi N., Tamagawa K., Kawai K., Fukui T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 989–994 (2000).
- 77) Takahashi N., Kubo Y., Iwahori A., Kawai K., Fukui T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 748–754 (2000).
- 78) Takahashi N., Iwahori A., Kawai K., Fukui T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **360**, 113–120 (1998).
- 79) Shimizu K., Qi X. R., Maitani Y., Yoshii M., Kawano K., Takayama K., Nagai T., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 741–746 (1998).